

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年10月6日 (06.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/093061 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 1/21, 5/10, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/53, 33/566

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005780

(22) 国際出願日: 2005年3月28日 (28.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-097070 2004年3月29日 (29.03.2004) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社  
総合医科学研究所 (SOIKEN INC.) [JP/JP]; 〒5600082  
大阪府豊中市新千里東町1丁目4番2号 Osaka (JP).

(71) 出願人および  
(72) 発明者: 白岩 俊彦 (SHIRAIWA, Toshihiko). 金藤 秀明  
(KANETO, Hideaki). 宮塚 健 (MIYATSUKA, Takeshi).

(74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所  
(HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目  
北2番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).

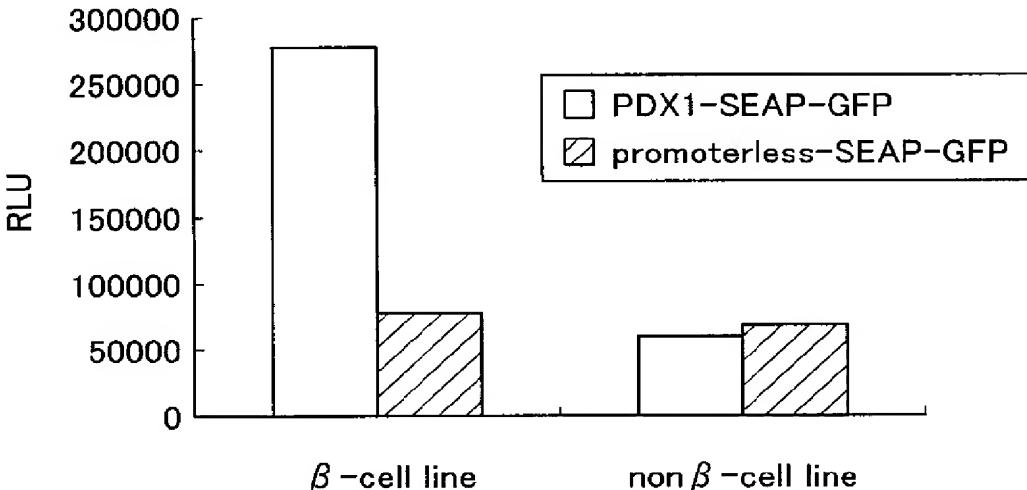
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

/ 続葉有

(54) Title: METHOD OF ANALYZING PANCREATIC  $\beta$ -CELL AMOUNT AND/OR PANCREATIC  $\beta$ -CELL FUNCTION AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 膵  $\beta$  細胞量及び/又は膵  $\beta$  細胞機能の解析方法およびその利用



(57) Abstract: The amount of pancreatic  $\beta$ -cells and/or the function of pancreatic  $\beta$ -cells can be conveniently and accurately analyzed in real time by a method which comprises analyzing the amount of pancreatic  $\beta$ -cells and/or the function of pancreatic  $\beta$ -cells by using a biological sample having a recombinant expression vector, wherein a reporter gene is bonded under the control by a pancreatic  $\beta$ -cell-specific gene promoter region, transferred thereinto.

(57) 要約: 膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターを導入した生体試料を用いて、膵  $\beta$  細胞量及び/又は膵  $\beta$  細胞機能を解析する方法によれば、リアルタイムに、そして簡便かつ正確に膵  $\beta$  細胞量及び/又は膵  $\beta$  細胞機能を解析することができる。

WO 2005/093061 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

臍  $\beta$  細胞量及び／又は臍  $\beta$  細胞機能の解析方法およびその利用  
技術分野

[0001] 本発明は、臍  $\beta$  細胞量及び／又は臍  $\beta$  細胞機能の解析方法およびその利用に関するものであり、特に、臍  $\beta$  細胞の細胞量や機能をリアルタイムにモニタリングすることができる臍  $\beta$  細胞量及び／又は臍  $\beta$  細胞機能の解析方法およびその利用に関するものである。

## 背景技術

[0002] 糖尿病は、臍のインスリン産生細胞 ( $\beta$  細胞) のインスリン分泌不全ないしインスリンの標的細胞での作用不全の結果生じる糖、タンパク質、脂質の代謝異常である。本疾患は、複数の遺伝子異常に起因するものであるが、感染、肥満、運動不足などの環境因子が加わって発症し、共通して多飲、多尿、体重減少などの特徴ある症状を呈するに至る。

[0003] 本疾患のわが国での患者総数は年々増加の傾向にあり、1990年代では数百万人を数え、40歳以上の成人の5~10%を占めるに至っている。このような糖尿病の病型は、臨床上、インスリン依存性糖尿病(1型糖尿病、IDDM)、インスリン非依存性糖尿病(2型糖尿病、NIDDM)、およびその他に大別される。

[0004] インスリン依存性の1型糖尿病とは、インスリン注射を欠くと直ちに生命に危険がおよぶことを意味し、ウイルス感染、ストレスそのほかの原因により誘発される抗原に対する自己抗体が臍  $\beta$  細胞を破壊し、インスリン産生が著しく低下して発症する疾患である。この1型糖尿病の発症は、25歳以下の若年者に多く、わが国でのこの病型の頻度は全患者の3%以下である。

[0005] また、インスリン非依存性の2型糖尿病とは、特殊型を除き、インスリン依存性以外を網羅する。原因は単一でないが、遺伝に基づく臍のインスリン分泌不足とインスリンの作用不足の結果、肝よりの糖放出の抑制低下と筋肉、脂肪組織での糖取込みの低下および脂肪酸、グリセロール、アミノ酸、糖中間代謝物の産生増加とこれによる肝の糖新生と脂肪、ケトン体の産生増加を招く。このため、高血糖[症]、ケトーシス(

ケトン血症)、高脂血症を惹起する。

[0006] 高血糖は腎の再吸収能を超えると尿糖排出、浸透圧性利尿、脱水を伴う。このため、高血糖が長期に持続すると、血管壁の変性や血管腔の狭窄を呈し、細胞内でソルビトール代謝を促進し、網膜症、腎症、末梢神経障害、心筋梗塞、脳梗塞などの血管合併症を生じることになる。

[0007] すなわち、1型糖尿病では、膵  $\beta$  細胞の広範な細胞死による、膵  $\beta$  細胞の絶対的な機能低下が直接の発症成因となり、また2型糖尿病では、先天的あるいは後天的な膵  $\beta$  細胞数の減少が糖尿病の発症・進展に関わる。

[0008] このように糖尿病とインスリンとは密接な関係を有するものであって、このインスリンを生体内において産生・分泌する唯一の器官が膵  $\beta$  細胞である。このため、糖尿病治療を目的として、膵  $\beta$  細胞の数を回復(増加)させたり、機能を高めたりする膵  $\beta$  細胞再生治療の開発が待たれている。そして現在、この膵  $\beta$  細胞再生治療の開発の前段階として、膵  $\beta$  細胞の機能解析、遺伝子の発現制御機構、酸化ストレスと糖尿病との関連性等の研究が数多く行われ、その成果が報告されている(例えば、非特許文献1、2参照)。なかでも、膵臓特異的遺伝子の発現を活性化し、膵臓の発生・分化に関与する因子として複数の転写因子が報告されている(例えば、非特許文献3参照)。

#### [非特許文献1]

Hideaki Kaneto et al., "Beneficial Effects of Antioxidants in Diabetes. -Possible Protection of Pancreatic  $\beta$ -Cells Against Glucose Toxicity-", DIABETES, VOL.48, p2398-p2406, DECEMBER 1999

#### [非特許文献2]

梶本佳孝著、「膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子の発現制御機構の解析」、糖尿病43(3):179~181、2000年

#### [非特許文献3]

梶本佳孝、山崎義光、堀正二共著、「膵臓の形態形成遺伝子とその異常」、G. I. Research vol.9 no.3, p57(241)~p64(248), 2001

上述したように、糖尿病の治療を目的に、膵  $\beta$  細胞の細胞数(または細胞量)を増

加させたり臍  $\beta$  細胞の機能を回復させたりする治療法または治療薬等の開発が望まれているが、これら治療法等の開発・評価に必須の技術である、臍  $\beta$  細胞量が増加したか否か、または機能が回復したか否かをリアルタイムに解析する技術は未だ開発されていない。

[0009] つまり、これまで糖尿病の診断や評価の手法として、死体から臍臓を取り出し、臍  $\beta$  細胞の細胞数(細胞量)の増減を観察することは行われていたが、生存している生物において、リアルタイムに臍  $\beta$  細胞の細胞数(または細胞量)の増減や臍  $\beta$  細胞の機能等を解析する技術は開発されていなかった。

[0010] したがって、糖尿病の治疗方法や治療薬等の開発のために、in vitro、ex vivo、あるいはin vivoにて臍  $\beta$  細胞の細胞数(または細胞量)の増減や臍  $\beta$  細胞の機能等を、リアルタイムに、そして簡便かつ正確に解析する方法の開発が強く求められていた。

[0011] 本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、in vivo、ex vivoあるいはin vitroにて臍  $\beta$  細胞の細胞数、細胞量の増減、または臍  $\beta$  細胞の機能等をリアルタイムに解析する方法、およびその利用を提供することにある。

## 発明の開示

[0012] 本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、臍臓特異的遺伝子の発現を活性化する転写因子pdx-1のプロモーターの支配下に、レポーター遺伝子(reporter gene)として分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP; human secreted alkaline phosphatase)を連結したプラスミドコンストラクトを調製し、これを導入した形質転換細胞またはトランスジェニック動物を作製したところ、SEAP活性を指標としてpdx-1の発現量をリアルタイムに解析することができるを見出した。そして、臍  $\beta$  細胞の細胞量が増加に伴いpdx-1の発現量も増加するという公知事実等と本現象に基づき、臍  $\beta$  細胞の細胞量または細胞機能をリアルタイムに評価・解析できるという本発明を完成させるに至った。

[0013] すなわち、本発明は産業上有用な方法または物質として、下記1)～12)の発明を含むものである。

[0014] 1)臍  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターを導入した生体試料を用いて、臍  $\beta$  細胞量及び／又は

臍  $\beta$  細胞機能を解析する解析方法。

[0015] 2) 上記解析方法は、上記組換え発現ベクターを生体試料に導入する形質転換工程と、上記形質転換工程によって得られる、上記組換え発現ベクターを導入した生体試料において発現するレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する検出工程と、上記検出工程によって得られる検出結果に基づき、臍  $\beta$  細胞量及び／又は臍  $\beta$  細胞機能を解析する解析工程と、を含む1)に記載の解析方法。

[0016] 3) 上記レポーター遺伝子は、細胞外分泌型の遺伝子産物をコードする遺伝子である場合、上記検出工程は、上記形質転換工程によって得られる、上記組換え発現ベクターを導入した生体試料から抽出液を抽出する抽出工程と、上記抽出工程によって得られる抽出液中に含まれるレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する抽出液検出工程と、を含む2)に記載の解析方法。

[0017] 4) さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含むことを特徴とする1)～3)のいずれかに記載の解析方法。

[0018] 5) 上記組換え発現ベクターは、さらにエンハンサー領域を有する1)～4)のいずれかに記載の解析方法。

[0019] 6) 上記臍  $\beta$  細胞特異的遺伝子とは、pdx-1遺伝子、NeuroD1遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子、インスリン遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、GLUT2遺伝子、およびアミリン遺伝子からなる群より選択される、少なくとも1つの遺伝子である1)～5)のいずれかに記載の解析方法。

[0020] 7) 臍  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクター。

[0021] 8) 上記7)に記載の組換え発現ベクターを導入した形質転換体。

[0022] 9) 上記1)～6)のいずれかに記載の解析方法を実施するための解析キット。

[0023] 10) 上記解析キットは、以下の(a)～(d)のうち、少なくとも1つの物質を含む9)に記載の解析キット：

(a) 臍  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクター；

(b) (a)の組換え発現ベクターを導入した形質転換体；

(c) (a)の組換え発現ベクターを動物細胞に導入するための試薬類；

(d) (a)のレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出するための試薬類。

[0024] 11) 抗糖尿病薬の候補物質をスクリーニングするスクリーニング方法であって、臍 $\beta$ 細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下に細胞外分泌型の遺伝子産物をコードするレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターを導入した生体試料に被験物質を投与する投与過程と、上記投与過程によって被験物質を付与した生体試料において発現するレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する検出過程と、上記検出過程によって得られる検出結果に基づき、臍 $\beta$ 細胞量及び／又は臍 $\beta$ 細胞機能を解析する解析過程と、上記解析過程によって得られた解析結果について、臍 $\beta$ 細胞量及び／又は臍 $\beta$ 細胞機能が改善していることを指標として、上記被験物質が抗糖尿病薬の候補物質であると判定する判定過程と、を含むスクリーニング方法。

[0025] 12) 被験物質の投与により糖尿病が治癒または改善されたか否かを判定する判定方法であって、臍 $\beta$ 細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下に細胞外分泌型の遺伝子産物をコードするレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターを導入した生体試料に被験物質を投与する投与過程と、上記投与過程によって被験物質を付与した生体試料において発現するレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する検出過程と、上記検出過程によって得られる検出結果に基づき、臍 $\beta$ 細胞量及び／又は臍 $\beta$ 細胞機能を解析する解析過程と、上記解析過程によって得られた解析結果について、臍 $\beta$ 細胞量及び／又は臍 $\beta$ 細胞機能が改善していることを指標として、上記被験物質の投与により糖尿病が治癒または改善されたと判定する判定過程と、を含む判定方法。

#### 図面の簡単な説明

[0026] [図1]本発明の実施例において用いたプラスミドコンストラクトの要部の構成を模式的に示す図である。

[図2]本発明の実施例において用いたpdx-1遺伝子のプロモーター領域の構成を模式的に示す図である。

[図3(a)]本発明の実施例において用いたプラスミドベクター:pIRES-hrGFP-1aの構成を模式的に示す図である。

[図3(b)]本発明の実施例において用いたプラスミドベクター:pSEAP2-Basicの構成を模式的に示す図である。

[図4]本発明の実施例においてSEAP活性を測定した結果を示す図である。

[図5]本発明の実施例において内因性ALPがSEAP活性の測定に及ぼす影響を調べた結果を示す図である。

[図6]本発明の実施例においてトランスジェニックマウス(13Lineとネガティブコントール)におけるSEAP活性の測定結果を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0027] 本発明は、糖尿病の発症・進展に関する臍 $\beta$ 細胞の細胞量及び／又は臍 $\beta$ 細胞の機能について、臍 $\beta$ 細胞特異的遺伝子のプロモーター領域下流に配置したレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出することにより、リアルタイムに、そして簡便かつ正確に解析する方法およびその利用を提供するものである。このため、以下の説明では、まず本発明に係る解析方法について説明し、続いてその利用として、解析キット、およびスクリーニング方法について順に説明する。なお、本発明に係る組換え発現ベクター、形質転換体については、解析方法と密接に関連するため、解析方法と共に説明する。

#### [0028] [1] 解析方法

本発明に係る解析方法は、臍 $\beta$ 細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターを導入した生体試料を用いて、臍 $\beta$ 細胞量及び／又は臍 $\beta$ 細胞機能を解析する方法であればよく、その他の具体的な工程、材料、条件等は特に限定されるものではない。

[0029] ここでいう「臍 $\beta$ 細胞特異的遺伝子」とは、臍臓の実質内に散在する内分泌腺であるラングルハンス島(ラ島、臍島)の約70%を占める $\beta$ 細胞(B細胞)において、特異的に発現する遺伝子であることが好ましいが、臍 $\beta$ 細胞でのみ発現する遺伝子でなくとも、その遺伝子発現と臍 $\beta$ 細胞の細胞量あるいは臍 $\beta$ 細胞の機能とが密接に関連しており、該遺伝子の発現状態をモニター(検出・評価)することにより、臍 $\beta$ 細胞の細胞量あるいは機能を解析することができる特徴的な遺伝子であればよい。具体的には、例えば、各種哺乳動物におけるpdx-1(IPF1、STF-1、IDX-1、または

XIHbox8と称される場合もある)遺伝子(Ohlsson H et al, EMBO J 12: 4251-4259, 1993)、NeuroD1遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子等の転写因子や、インスリン遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、GLUT2遺伝子、アミリン遺伝子、などを挙げることができる。

[0030] これら胰  $\beta$  細胞特異的遺伝子のなかでも、pdx-1遺伝子が好ましい。このpdx-1遺伝子は、インスリン遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、GLUT2遺伝子、アミリン遺伝子の4つの胰  $\beta$  細胞特異的(あるいは特徴的)遺伝子とソマトスタチン遺伝子やHB-EGF遺伝子の各転写に共通して関わることが示されており、非常に重要な転写因子である。また、胰の初期発生にも関与することが知られており、pdx-1遺伝子ノックアウトマウス(ホモ欠損)では胰が欠失し、出生後早期に糖尿病により死亡することが報告されている(Jonsson J et al, Nature 371: 606-609, 1994)。

[0031] また「プロモーター領域」とは、いわゆる転写プロモーター(transcriptional promoter)のことをいい、遺伝子の転写開始を調節するDNA上の領域をいう。本発明に用いられる「胰  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域」としては、上述の遺伝子のプロモーター領域であればよく、その具体的な塩基配列などは限定されるものではないが、例えば、後述する実施例に示すように、mouse PDX-1 promoter (Acc. No.: NT\_039324 REGION: 1408972…1418141)などを用いることができるであろう。

[0032] また「プロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクター」とは、上記プロモーターが、レポーター遺伝子を発現しうるように連結され、ベクター内に導入されればよく、組換え発現ベクターとしての具体的な構造は特に限定されるものではない。なお、組換え発現ベクターの構築については後述する。

[0033] ここでいう「レポーター遺伝子」とは、遺伝子発現の指標となる遺伝子のことであり、in vitro、ex vivo、またはin vivoのいずれかの状態において、その遺伝子発現を簡便に検出することができる遺伝子のことである。このようなレポーター遺伝子としては、例えば、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子等が挙げられる。なお、レポーター遺伝子としては、バックグラウンドがないこと、遺伝子発現を定量的に検出できる高感度の検出方法が確立していること、形質転換細胞への影響が少ないと、等の諸性質を有することが好ましい。具体的には、例えば、トランスポゾンTn9由来のク

ロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(CAT;chloramphenicol acetyltransferase)、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子( $\beta$ -D-galactosidase)、大腸菌由来の $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子(GUS; $\beta$ -D-glucuronidase)、ホタルや海洋性発光細菌Vibrio細菌由来のルシフェラーゼ(luciferase)、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(GFP;Green Fluorescence Protein)、クラゲ由来のイクオリン、アルカリフオスファターゼ(ALP;alkaline phosphatase)などが挙げられる。なお、後述する実施例では、ヒト由来の細胞外分泌型のALP(SEAP)を使用している。

[0034] また「組換え発現ベクターを導入した生体試料」とは、上記組換え発現ベクターを導入した形質転換体のことをいい、「生体試料」とは細胞、組織、器官、動物個体等が含まれる意である。なお、後述する実施例に示すように、本発明に係る方法は、トランジジェニック動物においても実施可能であることが示されている。したがって、かかる形質転換体には、形質転換細胞以外にも、トランジジェニック動物が含まれる。ここでいう動物とはヒト以外の哺乳動物(非ヒト哺乳動物)およびその他の脊椎動物をいい、特に実験動物として好適なマウス、ラット、モルモット、イヌ、ウサギ、サル、チンパンジー等が好ましい。

[0035] 例えば、形質転換した細胞、組織、器官を用いることにより、in vitro、ex vivoにて本発明に係る解析方法を実施することができるであろうし、形質転換した実験動物(トランジジェニック動物)を用いることにより、in vivoにて本発明に係る解析方法を実施することができる。なかでも、形質転換した実験動物を用いる解析方法の場合、生体において、リアルタイムに臍 $\beta$ 細胞量及び/又は臍 $\beta$ 細胞の機能を解析することができ、非常に有用であるといえる。

[0036] さらに「臍 $\beta$ 細胞量」とは臍島における $\beta$ 細胞の量(または細胞の数)のことであり、「臍 $\beta$ 細胞機能」とは臍 $\beta$ 細胞のホルモン分泌機能等のことであり、例えば、最も重要な代謝ホルモンであるインスリンの産生・分泌機能を挙げることができる。

[0037] 上述したように、本発明に係る解析方法では、臍 $\beta$ 細胞において特異的に発現する遺伝子のプロモータ下流にレポーター遺伝子を連結しているため、レポーター遺伝子の発現量をモニターすることにより、該臍 $\beta$ 細胞特異的遺伝子の発現量をモニターすることができる。ここで、臍島細胞量(臍 $\beta$ 細胞量)が増加する場合、臍 $\beta$ 細

胞特異的遺伝子(例えば、pdx-1遺伝子)の発現量が増加するという事実が知られている。また、糖尿病状態(膵  $\beta$  細胞糖毒性)において膵のインスリン産生能が低下した場合には、膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子(例えば、pdx-1遺伝子)の発現量が低下することが報告されている。なお、上記2つの公知事実は、以下の文献(i)～(v)に記載されている((i)Possible Protection of Pancreatic  $\beta$ -Cell Against Glucose Toxicity DIABETES, VOL 48, P2398-2406, 1999、(ii)Glucose Toxicity in  $\beta$ -Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection DIABETES, VOL 52, P581-587, 2003、(iii)Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, P10857-10862 Medical Sciences, 1999、(iv)Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. DIABETES, VOL 50, P581-587, 2001、(v)Glycation-dependent, Reactive Oxygen Species-mediated Suppression of the Insulin Gene Promoter Activity in HIT Cells J. Clin. Invest. Volume 99, Number 1, P144-150 1997)。

[0038] したがって、本解析方法によれば、膵  $\beta$  特異的遺伝子の発現量を、レポーター遺伝子を通じて評価することにより、リアルタイムに、これら膵  $\beta$  細胞の量(または細胞数)の増減や、膵  $\beta$  細胞のインスリン産生能の状態(インスリン産生能が高いか低いか)などを解析・評価することができる。つまり、「膵  $\beta$  細胞量及び／又は膵  $\beta$  細胞機能を解析する」ことができる。

[0039] 本発明に係る解析方法の具体的な工程として、例えば、形質転換工程、検出工程(抽出工程、抽出液検出工程)、解析工程を挙げることができる。かかる工程を含む解析方法によって、リアルタイムに、そして簡便かつ正確に膵  $\beta$  細胞の細胞量や機能を解析することができる。なお、本解析方法は、組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含んでいてもよい。以下、各工程について説明する。

[0040] [1-1]発現ベクター構築工程

本発明において行われる発現ベクター構築工程は、上述した「膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域」の支配下に、上述した「レポーター遺伝子」を連結した組換え発現ベクターを構築する工程であれば特に限定されるものではない。つまり、上

記プロモーターによって上記レポーター遺伝子が発現するように組換え発現ベクターを構築する工程であればよい。このため、導入する宿主細胞、組織、器官、動物個体等に応じて、その配列の順序やベクターの材料等を好適に選択することができる。

[0041] 上記組換え発現ベクターの母体となるベクターとしては、従来公知の種々のベクターを用いることができる。例えば、プラスマド、ファージ、またはコスマド等を用いることができ、導入する宿主細胞(動物細胞)や導入方法に応じて適宜選択することができる。具体的には、例えば、pBR322、pBR325、pUC19、pUC119、pBluescript、pBluescriptSK、pBI系のベクター等を挙げることができる。

[0042] 上記組換え発現ベクターは、上記プロモーターおよび上記レポーター遺伝子に加えて、さらに他のDNAセグメントを含んでいてもよい。当該他のDNAセグメントは特に限定されるものではないが、ターミネーター、選別マーカー、エンハンサー、翻訳効率を高めるための塩基配列等を挙げることができる。

[0043] ターミネーターは転写終結部位としての機能を有していれば特に限定されるものではなく、公知のものであってもよい。上記組換え発現ベクターにおいては、ターミネーターを適当な位置に配置することにより、動物細胞に導入された後に、不必要に長い転写物を合成したり、強力なプロモーターがプラスマドのコピー数を減少させたりするような現象の発生を防止することができる。

[0044] 上記選別マーカーとしては、例えば薬剤耐性遺伝子を用いることができる。かかる薬剤耐性遺伝子の具体的な一例としては、例えば、アンピシリン、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール等に対する薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。これにより、上記抗生物質を含む培地中で生育する形質転換体を選択することによって、上記組換え発現ベクターが導入された形質転換体を容易に選別することができる。また、後述する実施例に示すように、上記レポーター遺伝子の下流にGFP等のレポーター遺伝子をさらに連結することも可能である。

[0045] また、エンハンサーは、一本のデオキシリボ核酸(DNA)鎖上の、すなわちcisの位置にある、近傍の遺伝子の転写開始を促進するDNA上の塩基配列部分であればよい。例えば、サル由来のウイルスsimian virus 40(SV 40)の複製開始点の近くに存在

する72塩基の反復配列をエンハンサーとして利用することができる。なお、これ以外にも、従来公知のエンハンサー配列を用いることができる。このようなエンハンサーを用いると、プロモーター領域のみではレポーター遺伝子の発現が弱い場合でも転写活性を高めることができる。このため、確実にレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出することができるようになる。このように、上記組換え発現ベクターには、その目的や導入する細胞等の種類に応じて、さまざまなDNAセグメントを含ませることができる。

[0046] 上記組換え発現ベクターの構築方法についても特に限定されるものではなく、適宜選択された母体となるベクターに、上記プロモーター、レポーター遺伝子、および必要に応じて上記他のDNAセグメントを所定の順序となるように導入すればよい。例えば、上記レポーター遺伝子とプロモーターと(必要に応じてエンハンサー、ターミネーター等)とを連結して発現カセットを構築し、これをベクターに導入すればよい。

[0047] 発現カセットの構築では、例えば、各DNAセグメントの切断部位を互いに相補的な突出末端としており、ライゲーション酵素で反応させることで、当該DNAセグメントの順序を規定することが可能となる。なお、発現カセットにターミネーターが含まれる場合には、上流から、上記プロモーター、上記レポーター遺伝子、ターミネーターの順となっていればよい。さらに、発現カセットにエンハンサーが含まれる場合には、上流から、上記プロモーター、エンハンサー、上記レポーター遺伝子の順となっていればよい。また、組換え発現ベクターを構築するための試薬類、すなわち制限酵素やライゲーション酵素等の種類についても特に限定されるものではなく、市販のものを適宜選択して用いればよい。

[0048] また、上記組換え発現ベクターの増幅(増殖)方法(生産方法)も特に限定されるものではなく、従来公知の方法を用いることができる。一般的には大腸菌をホストとして当該大腸菌内で増殖させればよい。このとき、ベクターの種類に応じて、好ましい大腸菌の種類を選択してもよい。

[0049] [1-2]形質転換工程  
本発明において行われる形質転換工程は、上記[1-1]欄で説明した組換え発現ベクターを生体試料に導入して形質転換体を得て、該形質転換体において上記レポーター遺伝子を発現させる工程であればよい。

[0050] 上記組換え発現ベクターを宿主細胞に導入する方法(形質転換方法)は特に限定されるものではなく、宿主の動物細胞に応じた適切な従来公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、塩化カルシウムで処理し、人為的にコンピテントセルを作製する方法や直接動物細胞に導入する方法を用いることができる。組換え発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法(電気穿孔法)、ポリエチレングリコール法、ペーティクルガン法、プロトプラスト融合法、リン酸カルシウム法等を用いることができる。

[0051] 上記組換え発現ベクターが導入される宿主細胞としては、例えば、哺乳動物の胚性幹細胞や体性幹細胞、体細胞(骨髓、肝、腸管の細胞など)などを好適に用いることができるが、特に、臍臓の $\beta$ 細胞や臍臓における未分化細胞が好適である。これは、上述したように、導入する組換え発現ベクター上のプロモーターが、臍 $\beta$ 細胞に特異的な遺伝子のプロモーターであって、この発現を指標として臍 $\beta$ 細胞の細胞量及び/又は機能を解析することが本願発明の目的だからである。

[0052] ここで、本発明に係る解析方法においては、上記組換え発現ベクターは、解析しようとする動物の種類に合わせて適切なものを適宜構築してもよいが、汎用的な組換え発現ベクターを予め構築しておく、それを動物細胞に導入してもよい。すなわち、本発明に係る解析方法においては、上記[1-1]欄で説明した組換え発現ベクター構築工程が含まれていてもよいし、含まれていなくてもよい。

[0053] また、上記形質転換工程によって得られた形質転換体が市販されていたり、または別の場所で作製された形質転換体を用いたりして、以下の検出工程以降の工程を行い、本解析方法を実施することもできる。この場合、形質転換工程と検出工程以降の工程とが連続していないようにも見受けられるが、巨視的に捉えると、各工程は一連の流れに沿って行われていると考えられる。したがって、このように本解析方法の各工程が時間・場所を異にして行われる場合であっても、本願発明の技術的範囲に属することに留意すべきである。

[0054] [1-3]検出工程

本発明において行われる検出工程は、上記[1-2]欄で説明した形質転換体において発現するレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する工程であればよい。かかる

遺伝子産物としては、例えば、mRNA、タンパク質などが挙げられるが、レポーター遺伝子として発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子を選択している場合は、タンパク質がより好適である。

[0055] かかるレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出するための方法としては、レポーター遺伝子に応じた従来公知の方法を好適に利用可能である。例えば、レポーター遺伝子としてGFPを用いた場合は、その発光強度を測定することにより、レポーター遺伝子の遺伝子産物を定量的に検出可能である。また、後述の実施例に示すように、レポーター遺伝子としてALPを用いた場合、ALP活性を測定することでレポーター遺伝子の遺伝子産物を定量的に検出可能である。この際、例えば、市販のALP活性検出キット等を用いることにより、より一層簡便に検出を行うことができるであろう。

[0056] また、上記遺伝子産物がmRNAである場合、定量的RT-PCRを行うことも可能である。かかる定量的RT-PCRとして、いわゆるリアルタイムPCRを行うことも可能である。リアルタイムPCRとしては、インカレーター法、TaqMan プローブ法、サイクリングプローブ法等の従来公知の手法を用いることができる。定量的PCR等を行わない場合、最も一般的には、核酸を含む試料を電気泳動にかけ、サザンプロットやノーザンプロットを行った後、検出可能な標識物質でラベルされたプローブを用いて定量することも可能である。また、多種類の核酸を同時に定量する場合には、これらの手法と共に、又はこれらの手法に代えて、DNAチップやDNAマイクロアレイを用いてもよい。

[0057] また、本発明に係る解析方法では、上記レポーター遺伝子として、細胞外分泌型の遺伝子産物をコードする遺伝子を用いることが好ましい。このようなレポーター遺伝子としては、例えば、もともと細胞外分泌のためのシグナルペプチドを有するタンパク質をコードする遺伝子や、該シグナルペプチドとレポーター遺伝子とを融合させたキメラタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

[0058] この場合、レポーター遺伝子にコードされるタンパク質(遺伝子産物)は、形質転換された細胞の外に分泌されるため、例えば、形質転換細胞の培養液上清やトランスジェニック動物の血液や尿を回収することにより、細胞や動物に損傷を与えることなく、レポーター遺伝子産物を回収・検出することができる。したがって、上記レポーター

遺伝子として、細胞外分泌型の遺伝子産物をコードする遺伝子を用いる場合、本検出工程には、少なくとも以下の抽出工程、抽出液検出工程が含まれることになる。

[0059] [1-3-1] 抽出工程

本発明において行われる抽出工程は、上記[1-2]欄で説明した形質転換体から抽出液を抽出する工程であればよい。ここで「抽出液を抽出する」とは、生体試料が細胞、組織、器官等である場合、レポーター遺伝子の遺伝子産物が含まれる抽出液、例えば、細胞や組織等の培養液上清を回収することをいう。一方、生体試料が動物個体である場合、レポーター遺伝子の遺伝子産物が含まれる、該動物個体における末梢血液、末梢体液、尿等を回収することをいう。したがって、レポーター遺伝子としては、細胞外分泌型であって、培養液上清や尿等に分泌されるものを適宜選択することが好ましい。

[0060] このような抽出工程を設けることにより、細胞や組織、そして動物個体を損傷させることなく、リアルタイムにレポーター遺伝子の遺伝子産物を回収することができる。

[0061] なお、上記抽出液を抽出(回収)する工程の具体的手法は、特に限定されるものではなく、従来公知の方法を用いることができる。例えば、細胞培養液上清を回収する場合は、遠心分離や濾過等の方法を用いることができるであろうし、血液を回収する場合は、注射器によって採血すればよい。また、尿を回収する場合は動物の排泄物を回収すればよく、より一層簡易であるといえる。

[0062] [1-3-2] 抽出液検出工程

本発明において行われる検出工程は、上記[1-3-1]欄で説明した抽出液(培養液上清や尿、血液等)を用いて、該抽出液中に含まれるレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する工程であればよい。

[0063] なお、抽出液中のレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する工程は、上述の検出工程と同様に行うことができるため、ここではその説明を省略する。

[0064] [1-4] 解析工程

本発明において行われる検出工程は、上記[1-3]欄で説明した検出工程において得られた検出結果に基づき、臍 $\beta$ 細胞量及び／又は臍 $\beta$ 細胞機能を解析する工程であればよい。すなわち、上記検出工程においてレポーター遺伝子の遺伝子産物

についての定量的な検出を行った後、その定量値に基づき、臍  $\beta$  細胞の細胞量や機能を解析・評価することになる。例えば、本解析工程では、レポーター遺伝子の遺伝子産物の定量値が増加していれば、臍  $\beta$  細胞の細胞量が増加及び／又は臍  $\beta$  細胞の機能が改善(回復)していると判断することができる。一方、レポーター遺伝子の遺伝子産物の定量値が減少していれば、臍  $\beta$  細胞の細胞量が減少及び／又は臍  $\beta$  細胞の機能が悪化していると判断することができる。

[0065] また、本願明細書において、本解析工程とは、例えば、「検出工程によって得られた検出結果(定量値)を統計学的に解析する解析工程」と換言することができる。なお、この統計学的に解析する工程とは、例えば、t検定やノンパラメトリック検定等の従来公知の検定手法によって行うことができる。

[0066] [1-5] その他の工程、その他の方法

本発明に係る解析方法においては、上記形質転換工程や、さらに上記組換え発現ベクター構築工程が含まれていてもよいが、さらに他の工程が含まれていてもよい。具体的には、形質転換後の生体試料から適切な形質転換体を選抜する選抜工程等を挙げることができる。

[0067] 選抜の方法は特に限定されるものではなく、例えば、アンピシリン耐性等の薬剤耐性を基準として選抜してもよいし、形質転換体を培養・育成した後に、レポーター遺伝子の遺伝子産物を指標として選抜してもよい。

[0068] なお、本発明の主題は、臍  $\beta$  細胞の細胞量や細胞機能の客観的な解析(評価)方法を提供することに存するのであって、本明細書中に具体的に記載した個々の形質転換操作、抽出操作、検出操作、および解析操作に存するのではない。したがって、上記各操作以外の操作を用いた解析方法も本発明の範囲に属することに留意しなければならない。

[0069] [2] 利用

本発明に係る解析方法は、上述の利点を有するため、種々の利用が本発明には含まれる。以下、本発明に係る解析方法の利用法として、解析キット、スクリーニング方法、および判定方法について順に説明する。

[0070] [2-1] 解析キット

本発明に係る解析キットは、上記[1]欄で説明した解析方法を実施するためのものであればよく、これに含まれる具体的な構成、材料、機器等は、特に限定されるものではない。具体的には、上記解析方法の各工程を実施するための物が含まれていればよい。

[0071] 例えば、上記形質転換工程を実施するために、(a) 腺  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターが挙げられよう。また、(b) 上記(a)の組換え発現ベクターを導入した形質転換体が本解析キットに含まれていれば、形質転換工程を行う必要がなく、より簡易であるといえる。さらに、形質転換工程を実施するためには、(c) 上記(a)の組換え発現ベクターを動物細胞に導入するための試薬類が含まれていることが好ましい。本明細書でいう「試薬類」とは、各種試薬や実験器具、機器等を含む意である。かかる形質転換用の試薬類としては従来公知のものを利用でき、その具体的な構成は限定されるものではないが、例えば、形質転換の種類に応じた酵素やバッファー等を挙げることができる。その他、必要に応じてマイクロ遠心チューブ等の実験用素材を添付してもよいし、コンピュートセル作製用試薬や、ヒートブロック等の機器を含めることもできる。また、検出工程を実施するためには、(d) 上記(a)のレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出するための試薬類が含まれることが好ましい。このレポーター遺伝子の種類に合わせて各種検出用の試薬や実験器具を好適に組み合わせることができよう。

[0072] さらに、これら以外にも、例えば、発現ベクター構築工程を実施するための、各種材料や試薬が挙げられる。また、上記抽出工程に使用する採血するための機器として、注射器等が挙げられる。また、検出工程の場合は、上記レポーター遺伝子の遺伝子産物の検出を実施するために必要な物、例えば、各種試薬や実験器具、検出機器等が挙げられる。また、解析工程の場合は、上記解析工程を行うために必要な各種演算装置(例えば、コンピュータ等)が挙げられよう。

[0073] 上記の構成のような解析キットによれば、簡便かつ確実に本発明に係る解析方法を実施することができる。

[0074] [2-2]スクリーニング方法  
本発明の解析方法は、実験動物等を用いた薬物スクリーニングにおいて、薬物候

補物質の有効性を判定する方法に応用し得る。すなわち、本発明に係るスクリーニング方法は、上記組換え発現ベクターを導入した生体試料に被験物質を投与する投与過程と、この投与過程によって被験物質を付与した生体試料において発現したレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する検出過程と、この検出過程によって得られる検出結果に基づき、膵  $\beta$  細胞量及び／又は膵  $\beta$  細胞機能を解析する解析過程と、この解析過程によって得られた解析結果が、膵  $\beta$  細胞量及び／又は膵  $\beta$  細胞機能を改善していることを指標として、上記被検物質が抗糖尿病薬の候補物質であると判定する判定過程と、を含んでいればよく、その他の具体的な構成や条件などは特に限定されるものではない。すなわち、本スクリーニング方法は、上記本発明に係る解析方法を利用していればよいともいえる。

[0075] 例え、本スクリーニング方法において、上記レポーター遺伝子の遺伝子産物の定量値が増加していれば、該候補物質は、膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子の発現量を増加させる作用を有すると判断することができる。また上述したように、膵島細胞量(膵  $\beta$  細胞量)が増加する場合、膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子(例え、pdx-1遺伝子)の発現量が増加するという事実、および糖尿病状態(膵  $\beta$  細胞糖毒性)において膵のインスリン産生能が低下した場合には、膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子(例え、pdx-1遺伝子)の発現量が低下する事実が報告されている。このため、膵  $\beta$  細胞特異的遺伝子の発現量を増加させる物質は、膵  $\beta$  細胞量を増加させる物質、及び／又は、膵  $\beta$  細胞機能を改善させる物質であると判定することができる。

[0076] より詳細には、上記生体試料として形質転換細胞や組織を用いることによって、in vitroまたはex vivoにおいて、膵  $\beta$  細胞の細胞量を増加させる物質、または細胞機能を改善させる物質(因子)をスクリーニングすることができる。また、生体試料としてトランシスジェニック動物を用いることによって、in vivoにおいて、膵  $\beta$  細胞の細胞量を増加させる物質、または細胞機能を改善させる物質(因子)をスクリーニングすることができる。

[0077] したがって、本発明の解析方法を利用すれば、抗糖尿病薬の候補物質を容易かつ確実にスクリーニングすることができる。なお、ここでいう「抗糖尿病薬の候補物質」は、試験者が所望する任意の物質であり得る。また、「抗糖尿病薬の候補物質」は、膵

β細胞量を増加させる物質、及び／又は、膵β細胞機能を改善させる物質であるといえる。

[0078] [2-3]判定方法

本発明の解析方法は、実験動物等に対して被験物質を投与することにより糖尿病が治癒または改善されたか否かを判定する方法に応用し得る。すなわち、本発明に係る判定方法は、上記組換え発現ベクターを導入した生体試料に被験物質を投与する投与過程と、この投与過程によって被験物質を付与した生体試料において発現するレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する検出過程と、この検出過程によって得られる検出結果に基づき、膵β細胞量及び／又は膵β細胞機能を解析する解析過程と、この解析過程によって得られた解析結果について、膵β細胞量及び／又は膵β細胞機能が改善していることを指標として、上記被検物質の投与により糖尿病が治癒または改善されたと判定する判定過程と、を含んでいればよく、その他の具体的な工程、条件等は特に限定されるものではない。すなわち、本判定方法は、上記本発明に係る解析方法を利用していればよいともいえる。

[0079] 例えば、本判定方法において、上記レポーター遺伝子の遺伝子産物の定量値が増加していれば、該候補物質は、膵β細胞特異的遺伝子の発現量を増加させる作用を有すると判断することができる。このため、膵β細胞特異的遺伝子の発現量が増加している場合、その物質の投与によって、膵β細胞量が増加、及び／又は、膵β細胞機能が改善していると判断でき、ひいては糖尿病が治癒または改善されたと判定することができる。

[0080] より詳細には、上記生体試料として形質転換細胞や組織を用いることによって、in vitroまたはex vivoにおいて、糖尿病の治癒または改善を評価することができる。また、生体試料としてトランスジェニック動物を用いることによって、in vivoにおいて、糖尿病の治癒または改善を評価することができる。

[0081] したがって、本発明の解析方法を利用すれば、糖尿病の治癒または改善効果を容易かつ確実に評価(判定)することができる。このため、本発明を用いることにより、血糖値の低減や糖尿病の改善を謳う食品あるいは医薬品の治療(改善)効果を簡便かつ正確に評価することができる。

[0082] 以下実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

[実施例]

pdx-1遺伝子は、臍β細胞特異的遺伝子の発現を活性化し、臍臓の発生に不可欠な分化誘導因子として知られている。また、以下のようにpdx-1遺伝子のプロモーター活性やpdx-1遺伝子の発現に影響を与える種々の因子として、例えば、in vitroにおいて、insulin、glucagon-like peptide-1(GLP1)、thyroid hormone、heparine binding epidermal growth-like factor(HB-EGF)、TNF- $\alpha$ がpdx-1遺伝子のプロモーター活性を上昇させることが示されている(Susan C, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 2002, 277-284)。同様にin vitroにおいて、レチノイン酸投与により、pdx-1遺伝子の発現量が上昇することが報告されている(Sidhartha Singo Tulachan, et al. DIABETES 2003, 76-84)。また同じくin vitroにおいて、GLP-1により、pdx-1タンパク質の発現量が上昇することも報告されている(J. Buteau, et al. Diabetologia 1999, 856-864)。

[0083] このように、in vitroにおいて様々な物質がpdx-1遺伝子の発現量を上昇させることについて報告されている一方、今までにin vivoにおいて、pdx-1遺伝子の発現量を上昇させる物質および現象の報告はされていない。また、pdx-1遺伝子の発現の変化を簡便かつリアルタイムに解析する方法は開発されていない。

[0084] このため、pdx-1遺伝子の発現の変化を簡便かつリアルタイムに解析する方法を開発し、最終的には、in vivoにおけるpdx-1遺伝子の発現変化を解析するために、pdx-1遺伝子のプロモーターの支配下にレポーター遺伝子を連結したトランスジェニックマウスを作製することとした。具体的には以下のように行った。

[0085] (1) プラスミドコンストラクトの構築

まず、pdx-1遺伝子のプロモーター領域の支配下に分泌型アルカリフェオヌクレオタード

ゼ(SEAP;human secreted alkaline phosphatase)を連結したプラスミドコンストラクトを作製した。具体的には、C57BL6マウスの脾臓からgenomic DNAを採取し、pdx-1遺伝子のプロモーター領域(mouse PDX-1 promoter Accession #: NT\_039324 REGION: 1408972…1418141)を複製した。なお、複製は、図2に示すように、領域I、II、III、IVのすべてが含まれるように、pdx-1のORFの上流約-6. 5kbまでを複製した。この際使用したプライマーは、以下に示す。なお、複製後、シークエンスを確認した。

・プライマーPDX1pro\_f\_Hind3\_Spe1:

5'-ACCCAAGCTTGAAGTCAGGATCCAGGTTA-3'

・プライマーPDX1pro\_r\_Pst1: 5'-GTGTGTGTGAGTCTATTCTCAACTGCA-3'

・プライマーPDX1pro\_f\_Mlu1\_Pst1:

5'-GGACGACGCGTGACTAGTCCTCCAACATCAGACGTGCAC-3'

・プライマーPDX1pro\_r\_Sma1\_Not1:

5'-AAAAGGAAAAGCGGCCGCAGCCCCGGTCGGAGCTACAA-3'

次に、図3(a)に示すプラスミドベクターpIRES-hrGFP-1a(BD Biosciences製)のCMVプロモーター領域を制限酵素XbaIとNotIにて切り出した。そして、その切り出したXbaI-NotI間に、上記複製したpdx-1遺伝子のプロモーター領域を挿入した。

[0086] 次いで、図3(b)に示すプラスミドベクターpSEAP2-Basic(BD Biosciences製、GenBank Accession #: U89937)を制限酵素EcoRIとBsmIにて処理し、SEAPの構造遺伝子を含む断片を切り出した。続いて、このSEAP断片を、図3(a)に示すプラスミドベクターpIRES-hrGFP-1aのマルチクローニングサイト(MCS)におけるEcoRI-SalI間に挿入した。こうして構築したプラスミドコンストラクトを以下pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPと称する。

[0087] (2) *in vitro*におけるpPDX1pro-SEAP-IRES-GFPの機能確認

次に、*in vitro*におけるpPDX1pro-SEAP-IRES-GFPの機能確認を行った。すなわち、*in vitro*において、pdx-1遺伝子のプロモーターの支配下に発現した分泌型ALPの活性(SEAP活性)を測定した。具体的には、まず、このpPDX1pro-SEAP-IRES-GFPを $\beta$  cell lineとnon  $\beta$  cell lineとに導入した形質転換体を作製した。なお、ネガティブ

コントロールとして、pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPからプロモーターを欠失させたプラスミドp-promoterless-SEAP-IRES-GFPを構築し、同じく $\beta$  cell line(M6)とnon  $\beta$  cell line(HepG2)とに導入し、形質転換体を得た。

[0088] これらの形質転換体における、72時間後のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性をそれぞれ測定した。測定は、Chemilumineacent SEAP Assay Kit(BD Biosciences<sup>製</sup>)を用いて、添付のプロトコールに従い行った。その結果を図4に示す。なお、図中「PDX1-SEAP-GFP」はpPDX1pro-SEAP-IRES-GFPを有する形質転換体であり、「promoterless-SEAP-GFP」はp-promoterless-SEAP-IRES-GFPを有する形質転換体である。

[0089] 図4に示すように、pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPを導入した $\beta$  cell lineでは、ALP活性がRLU278687であるのに対して、pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPを導入したnon  $\beta$  cell lineでは、RLU61098であった。また、ネガティブコントロールとしてp-promoterless-SEAP-IRES-GFPを導入した $\beta$  cell lineおよびnon  $\beta$  cell lineはそれぞれ、RLU77610、RLU69298であった。この結果より、pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPは、臍 $\beta$ 細胞でのみ特異的に発現していることがわかった。このため、pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPは、有効に機能していることが示された。

[0090] (3) 内因性ALP活性の影響

続いて、内因性ALP活性が上記(2)欄で行ったSEAP Assayに及ぼす影響を検討した。具体的には、non  $\beta$  cell line(HepG2)およびマウス血漿中の内因性ALPがSEAP活性の測定に及ぼす影響について検討すべく、Chemilumineacent SEAP Assay Kitの実施の過程で行う65°C、30分間のインキュベーションにより、non  $\beta$  cell line(HepG2)およびマウス血漿中の内因性ALPが失活するか否か検討した。

[0091] その結果を図5に示す。なお、図中「plasma ALP1」、「plasma ALP2」はマウス血漿中の内因性ALPを示し、「HepG2 ALP」はnon  $\beta$  cell line(HepG2)中の内因性ALPを示す。

[0092] 図5に示すように、non  $\beta$  cell line(HepG2)およびマウス血漿中の内因性ALPは全て、65°C、30分間のインキュベーションにより失活することがわかった。このことから、

内因性ALP活性が上記(2)欄で行ったChemilumineacent SEAP Assayには全く影響を及ぼさないことが確認できた。したがって、上記(2)欄の結果は、pdx-1遺伝子のプロモーターの支配下で発現した分泌型ALP(SEAP)の活性のみを測定した結果であるといえる。

[0093] (4) *in vivo*におけるpPDX1pro-SEAP-IRES-GFPの機能確認

(4-1) pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPトランスジェニックマウスの作成

上記実施例の(1)欄で構築したプラスミドコンストラクトpPDX1pro-SEAP-IRES-GFPを用いて、pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPを有するトランスジェニックマウスの作出を行った。作出はトランスジェニックマウス作成会社である(株)SLC(Japan SLC Inc. 浜松)に依頼した。(株)SLCからは24lineのマウスが搬入された。それらのマウスにおいてジェノタイピングを行った結果、24line中、13line(以下、Line B, C, D, F, G, H, I, J, K, L, M, N, Oと称する場合もある)がトランスジーン陽性を示した。なお、ネガティブコントロールとしてtransgeneを有さない同胞マウス(以下、「SEAP(-)」と称する場合もある)を用いた。

[0094] (4-2) pPDX1pro-SEAP-IRES-GFPの機能確認

次に上記トランスジェニックマウスにおけるpPDX1pro-SEAP-IRES-GFPの機能確認をおこなった。上記(4-1)においてトランスジーン陽性を示した13lineについて、SEAP活性を測定した。SEAP活性の測定方法は以下のとおりである。

・SEAP活性の測定方法

測定は、Chemilumineacent SEAP Assay Kit (BD Bioscineces製)を用いて行った。

[0095] (i) Sample preparation

1. 血液20  $\mu$  lをPBS 180  $\mu$  lと混和し、遠心後に上清を分離した。
2. 上清 160  $\mu$  lを新しいチューブに移した(保存する場合は、-20°C)。

[0096] (ii) Chemilumineacent SEAP Assay

1. 十分量のChemilumineacent Enhancer と Assay Bufferを室温放置した。
2. 必要量の1×Dilution Buffer(付属の5×Dilution Buffer:dH<sub>2</sub>O=1:4)を準備し、室温放置した。
3. 溶かしたサンプル20  $\mu$  lを透明な0.5mlチューブに移した。

4. 上記3. のチューブに  $1 \times$  Dilution Buffer  $30 \mu l$ を加え、丁寧に混和した。
5. 上記4. のサンプルを $65^{\circ}\text{C}$  30min(以上)にて定温放置した(内因性ALPの不活性)。
6. 上記5. のサンプルを氷上にて冷却し室温まで冷ました。
7. Assay Buffer  $50 \mu l$ を各サンプルに加えて、5分間、室温放置した。
8. 1.  $25\text{mM}$  CSPDを準備(付属の $25\text{mM}$  CSPD:Chemilumineacent Enhancer= $1:19$ )した。
9. 上記8. で準備したCSPD $50 \mu l$ を各サンプルに加え10分間、室温放置した。
10. CSPD添加後、10~60分の間に測定した。

[0097] (iii) 結果

トランスジーン陽性を示したLineB, C, D, F, G, H, I, J, K, L, M, N, OにおけるSEAP活性の結果を図6に示す。同図より、いずれのLineにおいても、ネガティブコントロールのSEAP(−)と比較して、SEAP活性の著明な上昇が認められた。したがって、pPDX-1pro-SEAP-IRES-GFPは、in vivoにおいても有効に機能していることが確認された。

[0098] 以上の結果から、上記トランスジェニックマウスを用いて、in vivoにおいても本発明に係る解析方法を実施することができる事が明らかとなった。

### 産業上の利用の可能性

[0099] 本発明に係る解析方法によれば、膵 $\beta$ 細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の下流に配置されたレポーター遺伝子の発現を検出することにより、膵 $\beta$ 細胞特異的遺伝子の発現量を間接的にモニターすることができる。膵 $\beta$ 細胞の細胞量が増加するか、あるいは膵 $\beta$ 細胞の機能が改善すると、膵 $\beta$ 細胞特異的遺伝子(例えば、pdx-1遺伝子)の発現量が増加することが知られている。このため、本発明に係る解析方法によって膵 $\beta$ 細胞特異的遺伝子の発現量をモニターすることにより、リアルタイムに、そして簡便かつ正確に膵 $\beta$ 細胞量及び／又は膵 $\beta$ 細胞機能を解析することができるという効果を奏する。そして、本発明に係る解析方法は、例えば、抗糖尿病薬のスクリーニング方法や糖尿病の改善効果の評価判定方法等の有用な応用が可能である。

[0100] 以上のように、本発明に係る解析方法等は、胰 $\beta$ 細胞の細胞量やその機能をリアルタイムに、そして簡便かつ正確に解析することができるため、例えば、糖尿病に対する治療薬や治療方法、診断薬、診断方法等の開発に利用可能であろうし、また、糖尿病に対する治療効果を謳う健康食品や医薬品等の機能を評価することも可能である。このように、本願発明は、医療業、食品業等の幅広い分野に産業上の利用可能性を有するものである。

## 請求の範囲

[1] 脇  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターを導入した生体試料を用いて、脇  $\beta$  細胞量及び／又は脇  $\beta$  細胞機能を解析することを特徴とする解析方法。

[2] 上記解析方法は、上記組換え発現ベクターを生体試料に導入する形質転換工程と、  
上記形質転換工程によって得られる、上記組換え発現ベクターを導入した生体試料において発現するレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する検出工程と、  
上記検出工程によって得られる検出結果に基づき、脇  $\beta$  細胞量及び／又は脇  $\beta$  細胞機能を解析する解析工程と、を含むことを特徴とする請求項1に記載の解析方法。

[3] 上記レポーター遺伝子は、細胞外分泌型の遺伝子産物をコードする遺伝子である場合、  
上記検出工程は、上記形質転換工程によって得られる、上記組換え発現ベクターを導入した生体試料から抽出液を抽出する抽出工程と、  
上記抽出工程によって得られる抽出液中に含まれるレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する抽出液検出工程と、を含むことを特徴とする請求項2に記載の解析方法。

[4] さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含むことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の解析方法。

[5] 上記組換え発現ベクターは、さらにエンハンサー領域を有することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の解析方法。

[6] 上記脇  $\beta$  細胞特異的遺伝子とは、pdx-1遺伝子、NeuroD1遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子、インスリン遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、GLUT2遺伝子、およびアミリン遺伝子からなる群より選択される、少なくとも1つの遺伝子であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の解析方法。

[7] 脇  $\beta$  細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結したことを特徴とする組換え発現ベクター。

[8] 請求項7に記載の組換え発現ベクターを導入したことを特徴とする形質転換体。

[9] 請求項1～6のいずれか1項に記載の解析方法を実施するための解析キット。

[10] 上記解析キットは、以下の(a)～(d)のうち、少なくとも1つの物質を含むことを特徴とする請求項9に記載の解析キット。

(a) 脇 $\beta$ 細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下にレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクター。

(b) (a)の組換え発現ベクターを導入した形質転換体。

(c) (a)の組換え発現ベクターを動物細胞に導入するための試薬類。

(d) (a)のレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出するための試薬類。

[11] 抗糖尿病薬の候補物質をスクリーニングするスクリーニング方法であって、  
脇 $\beta$ 細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下に細胞外分泌型の遺伝子産物をコードするレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターを導入した生体試料に被験物質を投与する投与過程と、  
上記投与過程によって被験物質を付与した生体試料において発現するレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する検出過程と、  
上記検出過程によって得られる検出結果に基づき、脇 $\beta$ 細胞量及び／又は脇 $\beta$ 細胞機能を解析する解析過程と、  
上記解析過程によって得られた解析結果について、脇 $\beta$ 細胞量及び／又は脇 $\beta$ 細胞機能が改善していることを指標として、上記被検物質が抗糖尿病薬の候補物質であると判定する判定過程と、を含むことを特徴とするスクリーニング方法。

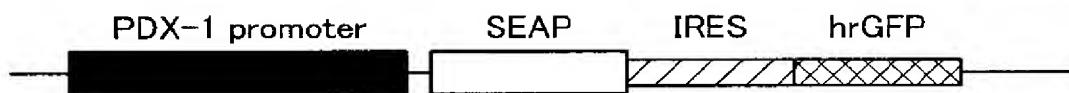
[12] 被験物質の投与により糖尿病が治癒または改善されたか否かを判定する判定方法であって、  
脇 $\beta$ 細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の支配下に細胞外分泌型の遺伝子産物をコードするレポーター遺伝子を連結した組換え発現ベクターを導入した生体試料に被験物質を投与する投与過程と、  
上記投与過程によって被験物質を付与した生体試料において発現するレポーター遺伝子の遺伝子産物を検出する検出過程と、  
上記検出過程によって得られる検出結果に基づき、脇 $\beta$ 細胞量及び／又は脇 $\beta$

細胞機能を解析する解析過程と、

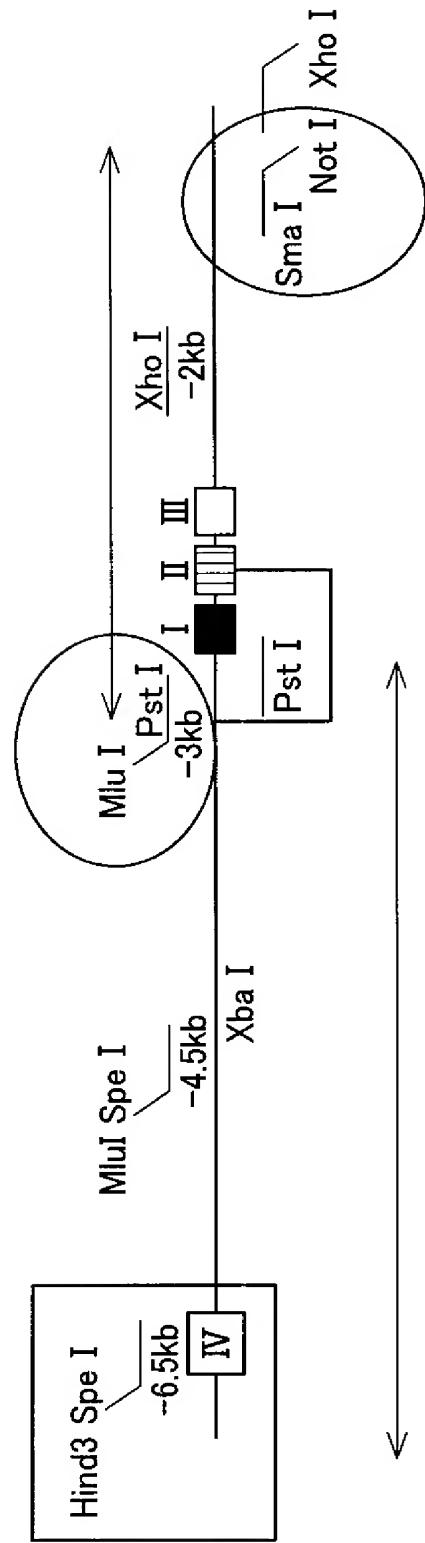
上記解析過程によって得られた解析結果について、膵  $\beta$  細胞量及び／又は膵  $\beta$  細胞機能が改善していることを指標として、上記被検物質の投与により糖尿病が治癒または改善されたと判定する判定過程と、を含むことを特徴とする判定方法。

[図1]

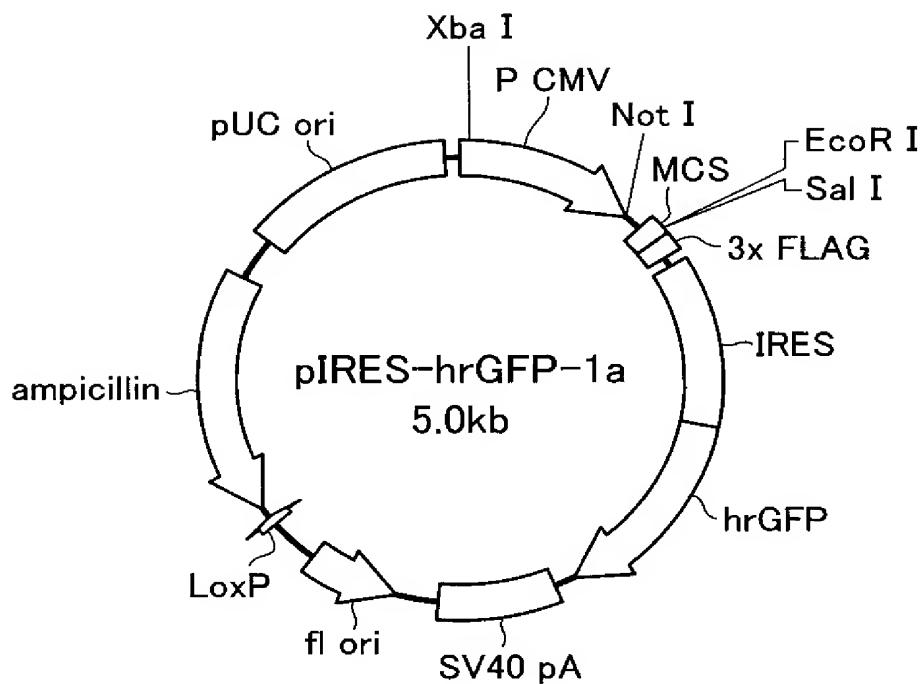
図 1



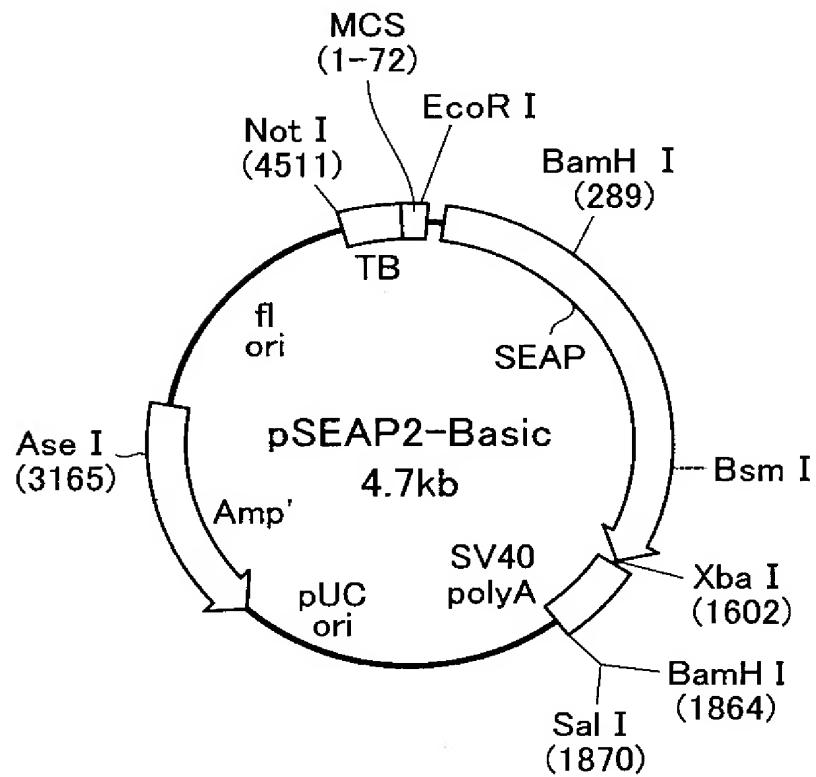
[図2]



[図3(a)]

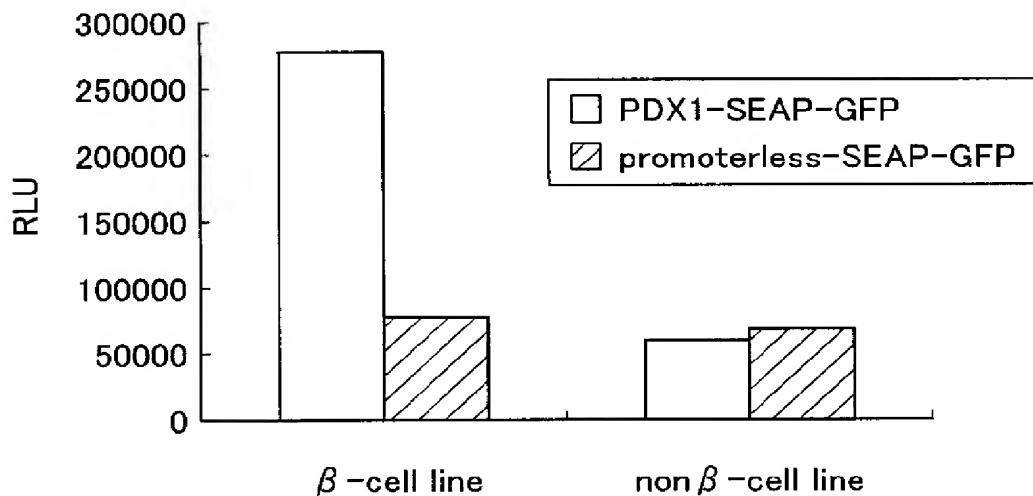


[図3(b)]

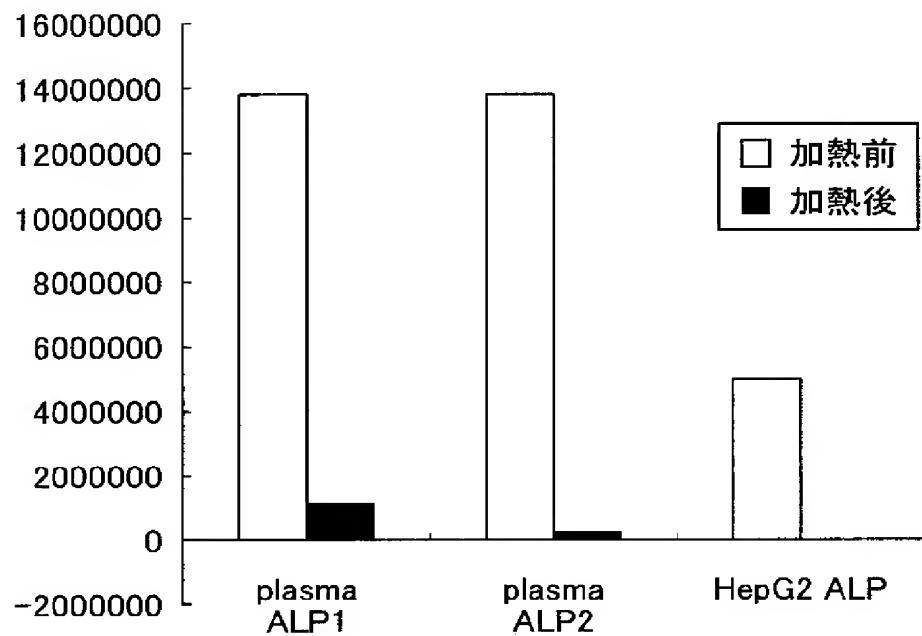


TB=Transcription blocker

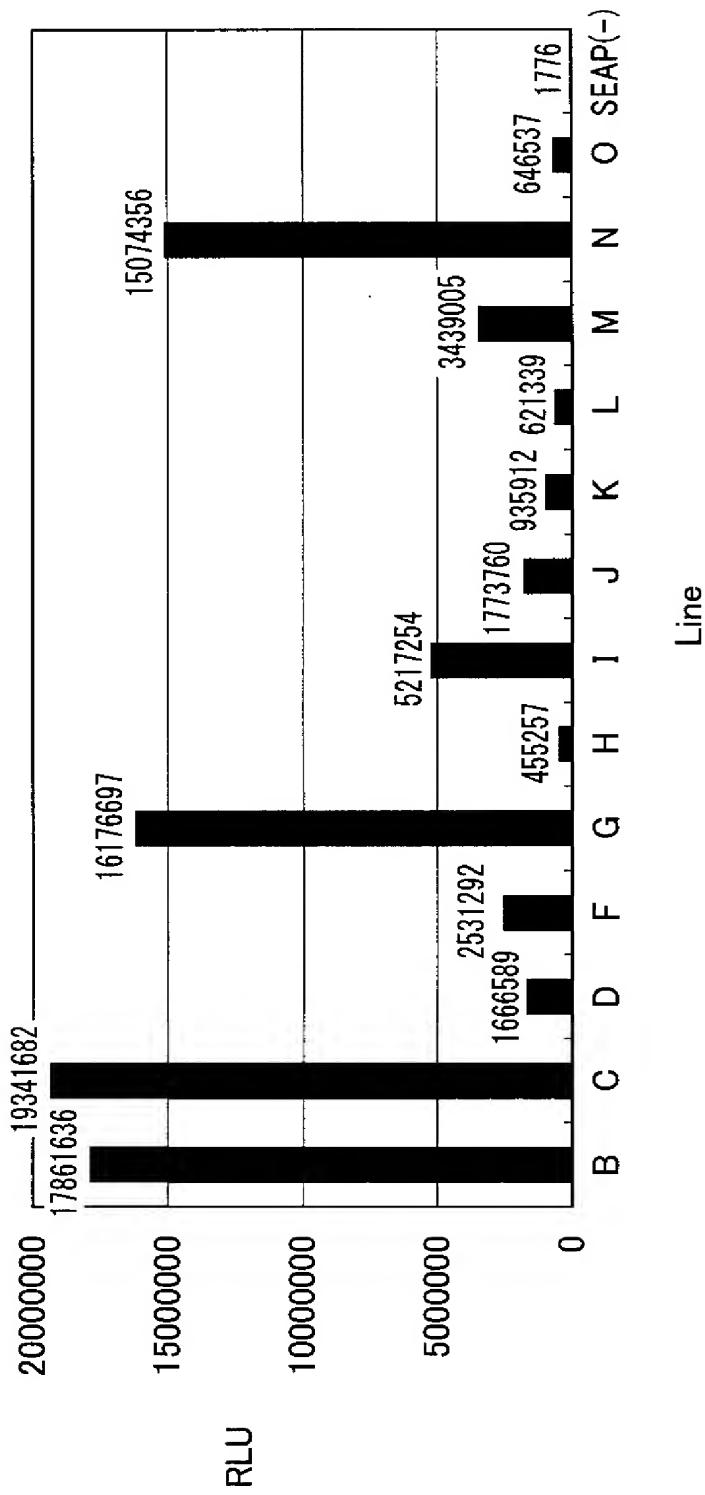
[図4]



[図5]



[図6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005780

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 1/21, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/53, 33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 1/21, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/53, 33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	C.W. Beck, "Gut specific expression using mammalian promoters in transgenic Xenopus laevis", Mechanisms of Development, 1999, Vol.88, pages 221 to 227, particularly, 2.2	7-8 1-11
X	WO 03/068357 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.), 21 August, 2003 (21.08.03), Claims & US 2004/005301 A1	7-8
X	DANIELLE Melloul, "Section 2: $\beta$ -Cell Genes: Functional Aspects Regulation of pdx-1 Gene Expression", DIABETES, 2002, Vol.51, suppl.3, p.S320-S325, full text	7-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
16 June, 2005 (16.06.05)Date of mailing of the international search report  
05 July, 2005 (05.07.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005780

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YUSUKE Moritoh, "Analysis of Insulin-Producing Cells During In Vitro Differentiation From Feeder-Free Embryonic Stem Cells", DIABETES, 2003, Vol.52, No.5, pages 1163 to 1168, full text	7-8
X	MAUREEN Gannon, "Regulatory Regions Driving Developmental and Tissue-Specific Expression of the Essential Pancreatic Gene pdx1", Developmental Biology, 2001, Vol.238, pages 185 to 201, full text	7-8
X	SUSAN C. Campbell, "Regulation of the pdx1 gene promoter in pancreatic $\beta$ -cells", Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, Vol.299, pages 277 to 284, full text	7-8
X	KEVIN Gerrish, "Pancreatic $\beta$ Cell-specific Transcription of the pdx-1 Gene", The Journal of Biological Chemistry, 2000, Vol.275, No.5, pages 3485 to 3492, full text	7-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/005780

**Box No. II      Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Since the biological sample in claim 12 involves an experiment animal such as a transgenic animal, it also involves the human body. Thus, it pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relates to a subject matter which this International (continued to extra sheet)

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III      Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/005780

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, 1/21, 5/10; C12Q1/02, 1/68, G01N33/53, 33/566

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, 1/21, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/53, 33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	C. W. Beck, "Gut specific expression using mammalian promoters in transgenic Xenopus laevis" Mechanisms of Development, 1999, Vol. 88, p. 221-227, 特に 2.2 項目参照	7-8 1-11
X	WO 03/068357 A2, (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2003. 08. 21, 特許請求の範囲等参照 & US 2004/005301 A1	7-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 06. 2005

国際調査報告の発送日

05.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N 9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	DANIELLE Melloul, "Section 2: $\beta$ -Cell Genes: Functional Aspects Regulation of pdx-1 Gene Expression" DIABETES, 2002, Vol. 51, suppl. 3, p. S320-S325, 文献全体参照	7-8
X	YUSUKE Moritoh, "Analysis of Insulin-Producing Cells During In Vitro Differentiation From Feeder-Free Embryonic Stem Cells" DIABETES, 2003, Vol. 52, No. 5, p. 1163-1168, 文献全体参照	7-8
X	MAUREEN Gannon, "Regulatory Regions Driving Developmental and Tissue-Specific Expression of the Essential Pancreatic Gene pdx1" Developmental Biology, 2001, Vol. 238, p. 185-201, 文献全体参照	7-8
X	SUSAN C. Campbell, "Regulation of the pdx1 gene promoter in pancreatic $\beta$ -cells" Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, Vol. 299, p. 277-284, 文献全体参照	7-8
X	KEVIN Gerrish, "Pancreatic $\beta$ Cell-specific Transcription of the pdx-1 Gene" The Journal of Biological Chemistry, 2000, Vol. 275, No. 5, p. 3485-3492, 文献全体参照	7-8

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求項12は、生体試料としてトランスジェニック動物等の実験動物も包含されることから、人体をも包含し得るので、人の身体の診断方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。